

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07313186 A**

(43) Date of publication of application: **05 . 12 . 95**

(51) Int. Cl

**C12P 21/08
G01N 33/577
// C12N 15/02
G01N 33/53
(C12P 21/08 , C12R 1:91)**

(21) Application number: **05027192**

(22) Date of filing: **25 . 01 . 93**

(71) Applicant: **EISAI CO LTD**

(72) Inventor: **WATANABE KEISUKE
NARAKI TORU
IWASAKI YOSHIHIRO**

(54) ANTI-PIVKA-II MONOCLONAL ANTIBODY

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a new PIVKA-II monoclonal antibody prepared by using PIVKA-II purified from a cultured human hepatic cell strain as an antigen and useful e.g. as a determination reagent for PIVKA-II clinically useful as a diagnostic marker for hepatic cell cancer.

CONSTITUTION: This new PIVKA-II monoclonal antibody useful as a clinical examination reagent for the diagnosis of hepatic cell cancer is produced by culturing a cultured cell strain of human hepatic cell (e.g. PLC/PRF/5) in a medium containing warfarin

potassium, collecting the supernatant, adding equal amount of 4M saturated ammonium sulfate to the supernatant, stirring the mixture for 2hr, separating the mixture by centrifugal separation, dissolving the precipitate in a 0.1M phosphate buffer solution, purifying the solution by anion exchange resin treatment, gel-filtration and prothrombin affinity column chromatography to produce PIVKA-II which is a vitamin K-dependent plasma protein, immunizing a mouse with the plasma protein, collecting the spleen cell from the mouse, fusing with a myeloma cell, cloning an antibody-producing strain by limiting dilution analysis and culturing the obtained hybridoma.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-313186

(43)公開日 平成7年(1995)12月5日

(51)Int.Cl. ⁶ C 12 P 21/08 G 01 N 33/577 // C 12 N 15/02 G 01 N 33/53	識別記号 B	府内整理番号 9161-4B	F I	技術表示箇所 C
		9281-4B	C 12 N 15/ 00	
		審査請求 未請求 請求項の数 5 FD (全 6 頁)		最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-27192

(22)出願日 平成5年(1993)1月25日

(71)出願人 000000217

エーザイ株式会社

東京都文京区小石川4丁目6番10号

(72)発明者 渡辺 啓祐

茨城県つくば市二の宮1-4-12

(72)発明者 楠木 徹

千葉県我孫子市つくし野3-12-401

(72)発明者 岩崎 吉宏

東京都江東区南砂1-25-14

(54)【発明の名称】 抗PIVKA-IIモノクロナール抗体

(57)【要約】

【目的】従来のPIVKA-II測定試薬においては測定できなかったPIVKA-IIを、新しいモノクローナル抗体を使用した免疫学的測定法により測定可能とする。

【構成】ヒト肝細胞培養細胞株が産生するPIVKA-IIを免疫用抗原とすることにより、新しい抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を作製する。本モノクローナル抗体を利用した免疫学的測定法により生物学的試料中のPIVKA-IIを測定可能とする測定試薬。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】人肝細胞培養細胞株より精製したPIVKA-IIを抗原として作製した抗PIVKA-IIモノクローナル抗体。

【請求項 2】人肝細胞培養細胞株がPLC/PRF/5、huH-1、huH-2、HepG2 またはHep3B である請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】人肝細胞培養細胞株より精製したPIVKA-IIを抗原として作製した抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 4】ハイブリドーマが P19B7である請求項 3 記載のハイブリドーマ。

【請求項 5】生体試料中のPIVKA-IIの免疫化学的測定法において、請求項 1 記載の抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を用いることを特徴とするPIVKA-IIの測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は人肝細胞培養細胞株が産生するPIVKA-IIを抗原としその抗原と反応するモノクローナル抗体の作製とその抗体を用いて生物学的試料中のPIVKA-IIを測定する測定試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】PIVKA-IIはビタミンK 依存性血漿蛋白質の一つであるプロトロンビンの前駆物質であって、アミノ末端領域にある10個のグルタミン酸残基についてのγ-カルボキシル化の程度が不完全なものを言う。当該カルボキシル化の程度が完全なものを正常プロトロンビンという。従って、PIVKA-IIとは正常プロトロンビンのγ-カルボキシグルタミン酸残基についての脱カルボキシル化体であるということもでき、PIVKA-IIという名称以外に異常プロトロンビン (Abnormal prothrombin) と呼ばれることもある。10個のグルタミン酸残基中いくつかがγ-カルボキシル化を受けるかにより数種類のPIVKA-IIが混在した状態で存在している。本発明は主として生物学的試料中のPIVKA-IIの測定を目的としているので、本発明におけるPIVKA-IIとは、特にことわらない限り、数種類のPIVKA-IIの混在状態を言う。10個のグルタミン酸残基についてのカルボキシル化の程度が完全なものを正常プロトロンビンと言う。

【0003】PIVKA-II測定の臨床的な有用性については、ビタミンK の不足状態あるいは抑制状態において当該γ-カルボキシル化が不完全となり、その結果PIVKA-IIが血液中に出現するので、ビタミンK の不足状態あるいは抑制状態のマーカーとしてその測定は臨床上重要である。PIVKA-IIとはProtein induced by vitamin K absence-I I の略称であり、これは上記生理的観点に基づいて命名されたものである。また最近では、肝細胞癌に伴って血液中にPIVKA-IIが出現することが見いだされ、従来肝細胞癌の良いマーカーとされているα-フェトプロテインが陰性の肝細胞癌患者においてもPIVKA-IIが高頻度に出現することにより、α-フェトプロテインと同等の臨床

的な有用性が認められている。PIVKA-IIとビタミンK および肝細胞癌との関連について参考のために下記文献1)から3)を列挙する。

1) Motohara K. Kuroki Y. Kan H. Endo F. Mtsuda I. , Detection of vitaminK deficiency by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for circulating abnormal prothrombin. Pediatric Research. , 19, 354-7, 1985 .

2) Okuda H. Obata H. Nakanishi T. Furukawa R. Hashimoto E. , Production of abnormal prothrombin (des-γ-carboxyprothrombin) by hepatocellular carcinoma. , Journal of Hepatology, 4, 357-63, 1987 .

3) Hattori N. Ohmizo R. Unoura M. Tanaka N. Kobayashi K. , Abnormal prothrombin measurements in hepatocellular carcinoma. , Journal of Tumor markeroncology, 3, 207-16, 1988.

【0004】PIVKA-IIの測定方法としては、ポリクローナルな抗PIVKA-II抗体を使用した競合ラジオイムノアッセイ法(Blanchard R. et al. Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease. The New England Journal of Medicine. , 305, 242-8, 1981) あるいは正常プロトロンビンを吸収後、残存するPIVKA-IIのトロンビン活性を測定する方法(Soulier J. et al. , A new method to assay des-γ-carboxyprothrombin. , Gastroenterology, 91:1258-62, 1986)などが報告されているが、いずれも材料の調製が繁雑であったり、測定系が複雑であったりして多数の臨床検体を扱う臨床検査の場においては実用的ではない。これらの方針に対して、抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を使用した特異的なPIVKA-II測定方法 (特開昭60-60557号) は非常に簡便であり、しかも正確に多数の検体が測定できるという特徴を持っており、現在その方法を使用した測定試薬が唯一のPIVKA-II測定診断薬として広く利用されている。

【0005】特開昭60-60557号の抗PIVKA-IIモノクローナル抗体は、ビタミンK拮抗剤を投与した患者の血漿中からPIVKA-IIを精製し、それを免疫用抗原としてマウスに免疫してPIVKA-IIに対するモノクローナル抗体を作製した。

【0006】特開昭60-60557号の抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を使用した特異的なPIVKA-II測定方法は非常に簡単であり、しかも正確に多数の検体が測定できるという特長を持っており、現在その方法を使用した測定試薬が唯一のPIVKA-II測定診断薬として広く利用され、肝細胞癌の診断および経過観察に使用されている。

【0007】
【発明が解決しようとする課題】特開昭60-60557号の抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を使用した特異的なPIVKA-II測定方法によると、肝細胞癌の陽性率は52.9% であった。(服部信、臨床と研究、65巻3号249~258 頁1988年) 本発明者らは、特開昭60-60557号で使用しているモ

ノクローナル抗体と特性の異なる抗体を作製し、測定試薬を構成することにより肝細胞癌での陽性率を上昇させることを目的に検討し、本発明を完成した。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、モノクローナル抗体を作製するための免疫用抗原であるPIVKA-IIを従来のごとくビタミンK拮抗剤投与患者血中から精製するのではなく人肝細胞培養細胞株から得ることにある。すでにこの人肝細胞培養株がPIVKA-IIを産生することは報告されている（奥田博明、肝胆脾第14巻第5号1987年5月759～766頁）

【0009】人肝細胞培養細胞株からPIVKA-IIを精製しこれを免疫源としてマウスに投与し常法に順じマウス脾臓細胞とマウスミエローマ細胞とを細胞融合させ、プロトロンビンと反応せずPIVKA-IIとのみ特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを確立する。また、確立したハイブリドーマクローンをマウス腹腔内に投与することにより腹水を得、腹水よりIgGを精製する。得られたIgGを第一抗体に、第二抗体に抗プロトロンビン抗体の二抗体法免疫測定法により生体試料中のPIVKA-IIを測定する。

【0010】以下に本発明を詳細に説明する。モノクローナル抗体の作製のための免疫用抗原であるPIVKA-IIの精製はPIVKA-II產生人肝培養細胞株の培養上清を硫安塩析、DEAE-Sephacel、Heparin-Sepharose、Blue-Sepharose、Ultrogel AcA44のゲル濾過およびプロトロンビンアフィニティーカラムにて得た。

【0011】抗PIVKA-IIモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の作製は、精製PIVKA-IIをマウスに免疫しその脾臓細胞を採取し、Koehler G.等の方法(Koehler G. Milstein C., Deviation of specific antibody-producing culture and tumor lines by cell fusion., Eur. J. Immunol., 6, 511-9, 1976)によりミエローマ細胞株P3U1と細胞融合、クローニングを行い、プロトロンビンと反応せず免疫用抗原PIVKA-IIとのみ反応する抗PIVKA-II抗体産生ハイブリドーマ細胞株を確立した。

【0012】抗PIVKA-II抗体産生ハイブリドーマ細胞株をマウスに投与し、腹水を得た後、腹水よりProtein AにてIgGを精製する。

【0013】本発明によるPIVKA-II測定法は、酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ法あるいはその他の測定法による二抗体サンドイッチ法を原理とし抗体としては、第一抗体に抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を使用し、第二抗体にはPIVKA-IIとプロトロンビンの共通抗原に対する抗体（抗プロトロンビン抗体と呼ぶ）を使用して生体試料中のPIVKA-IIを測定する。

【0014】次に本発明における二抗体サンドイッチ法を利用する測定法は例えば次のように実施される。なお、ここでは酵素免疫測定法の場合を示すが、ラジオイムノアッセイ法あるいはその他の方法においても本発明が使用

できることは言うまでもない。本発明測定試薬の具体的な構成を示せば次の如くになる。すなわち、本発明測定試薬はヒトトロンビンと反応する抗体を含まない抗ヒトプロトロンビン抗体を必須の構成成分とし、モノクローナル抗PIVKA-II抗体（単独または固相化したもの）、標準抗原、酵素及び基質よりなる群より任意に選択したものを組み合わせたもののセットである。ここにおいて、セット中に固相が含まれる場合に当該固相がモノクローナル抗PIVKA-II抗体によってコートされた状態で提供されること、あるいはセット中に抗ヒトプロトロンビン抗体と酵素とが含まれる場合に、両者がコンジュゲートした状態で提供されることは自由であり、これらも同様に本発明測定試薬の構成に含まれる。また測定の実施の便益のために適当なる抗原希釈液、反応希釈液、基質溶解液、反応停止液等がセット中に添付されることも自由であり、これらは本発明を限定するものではない。測定は抗PIVKA-IIモノクローナル抗体コート固相体に標準抗原または被検生物学的試料（血液、血漿または血清）を加えてインキュベートする。固相体を洗浄後、酵素標識抗プロトロンビン抗体（トロンビンと反応しない）を加えて再びインキュベートし、洗浄し、最後に基質を加えてインキュベート後、基質の分解量を分光光度計を用いて測定する。後記実施例によって示されるごとく、本発明測定試薬によってはじめて従来の測定感度の30倍の感度でのPIVKA-II測定が可能となる。

【0015】

【発明の効果】本モノクローナル抗体及びそれを用いたPIVKA-II測定試薬で測定することにより、従来のPIVKA-II測定試薬で測定できなかったPIVKA-II抗原が30倍の測定感度で測定可能となる。

【0016】

【実施例】以下に記載する実施例をもって本発明の効果を更に具体的に説明する。

実施例1

人肝細胞培養株の細胞培養とPIVKA-IIの精製

人肝細胞の培養細胞株をワルファリンカリウム10ug/mlを含むMEM培地で培養しその上清を採取する。培養上清中のPIVKA-IIの精製は、40リットルの培養上清に4M飽和硫安を等量加え、2時間攪拌後遠心分離した。沈澱物を

0.1Mリン酸緩衝液で溶解し透析した。DEAE-Sephacelにて0M～0.6M NaCl分画を行い、PIVKA-II画分を集め透析後Heparin-SepharoseおよびBlue-Sepharoseに通す。Ultrogel AcA44にてゲル濾過およびプロトロンビンアフィニティーカラムでPIVKA-IIを作製した。その最終回収率は、10%であった。

【0017】実施例2

抗PIVKA-IIモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株の確立

精製PIVKA-IIをマウスに12.5ug/匹で5回免疫をし、その脾臓細胞を採取して、Koehler G.等の方法(Koehler

G. Milstein C. Deviation of specific antibody producing culture and tumor lines by cell fusion., Eur. J. Immunol., 6, 511-9, 1976)によりミエローマ細胞株P3U1と細胞融合し、限界希釈法により3 クローニングを行い、プロトロンビンと反応せず免疫用抗原であるPIVKA-IIとのみ反応する抗PIVKA-IIモノクローナル抗体產生ハイブリドーマP19B7 を細胞株として確立した。

【0018】実施例3

測定法

抗PIVKA-IIモノクローナル抗体をエンザイムイムノアッセイ用マルチプレートへの固相化する方法は特開昭60-60557記載の常法により行う。このようにして得られた抗PIVKA-IIモノクローナル抗体コート固相に1 ウエル当たり被検検体100ulを注入し、4 ℃で一夜間インキュベートする。0.05M トリス-塩酸緩衝液pH7.5(0.05%Tween20)で3回洗浄後抗プロトロンビン抗体に酵素を標識した酵素標識抗体を100ul を加えて4 ℃で1 時間インキュベートする。0.05M トリス-塩酸緩衝液pH7.5 (0.05%Tween20)で3回洗浄後、ABTS 溶液100ul を加えて60分静置し、2mM アジ化ナトリウム100ul を加えて反応を停止して分光光度計により波長405nm の吸光度を測定する。この方法により測定した標準曲線を図1に示す。健常人8例を測定したところ0.002AU/ml以下であったのでこの測定試薬の検出限界は0.002AU/mlである(図2)。*

HCC (95例)

		本発明による測定試薬	
		+	-
特開昭60-60557号	+	23(24.3%)	0(0.0%)
	-	27(28.4%)	45(47.4%)
			50(52.6%)

LC (107例)

		本発明による測定試薬	
		+	-
特開昭60-60557号	+	3(2.8%)	0(0.0%)
	-	16(15.0%)	88(82.2%)
			19(17.8%)

【0021】このように、ヒト肝細胞培養細胞株が產生するPIVKA-IIを用いて抗PIVKA-IIモノクローナル抗体の作成ができた。また、特開昭60-605575号の抗PIVKA-IIモノクローナル抗体に比較して反応性が約30倍高く、従来のPIVKA-II測定試薬で測定されなかったPIVKA-IIがこの抗体により測定可能となった。

【図面の簡単な説明】

* 【図1】

【図2】

【0019】実施例4

得られたモノクローナル抗体の特性

モノクローナル抗体をマイクロカップに固相化し、実施例3 記載の方法に従いPIVKA-II陽性血漿を利用してモノクローナル抗体の特性比較を行った。結果を図3に示す。本発明により得られたモノクローナル抗体は特開昭60-605575号記載のモノクローナル抗体に比べ活性が10倍高い。

【図3】

【0020】実施例5

肝疾患患者血清中のPIVKA-IIの測定

肝疾患患者214人より得られた血清を特開昭60-605575号記載のモノクローナル抗体を使用したPIVKA-II測定試薬と本測定試薬により、PIVKA-II測定値を比較した。その結果を図2に示す。本発明によるモノクローナル抗体は、従来のPIVKA-II測定試薬で測定できなかったPIVKA-IIが測定でき、陽性率は28.3%上昇した(表1)。また従来のPIVKA-II測定試薬とはr2=0.252と相関しなかった(図4)。

【図4】

【表1】

※ 【図1】本発明により作製したモノクローナル抗体を使用した測定試薬の標準曲線

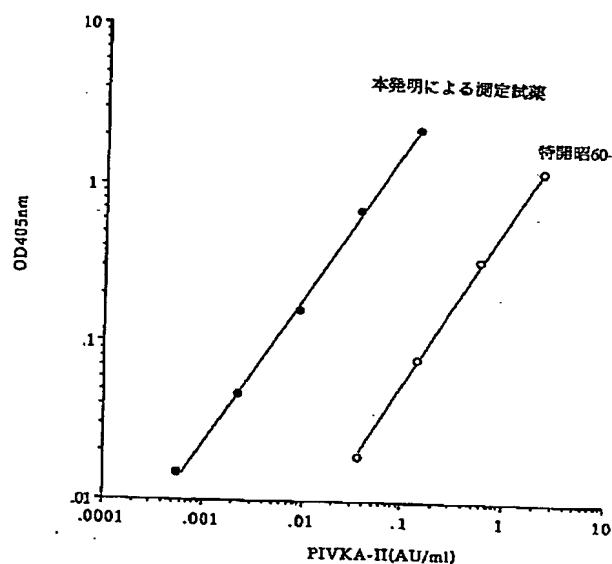
40 【図2】肝疾患患者検体中のPIVKA-IIの測定分布図

【図3】モノクローナル抗体間の活性比較

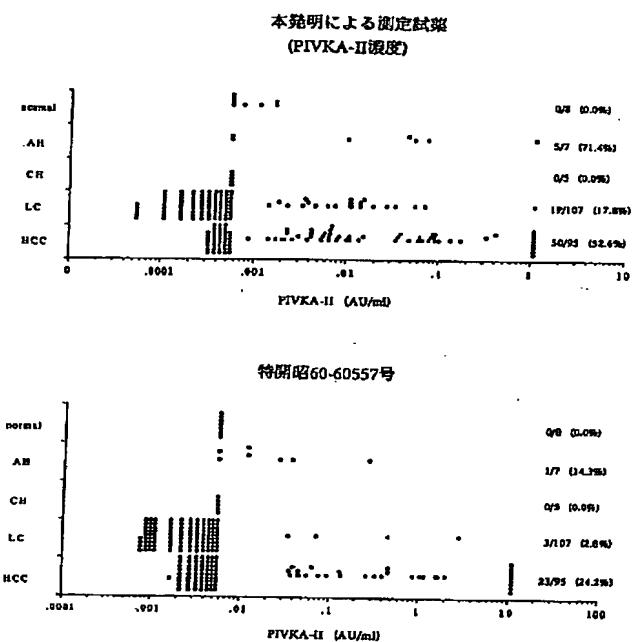
【図4】特開昭60-605575号記載のモノクローナル抗体を使用した測定試薬及び本発明によるPIVKA-II測定試薬間のPIVKA-II測定値の相関

※

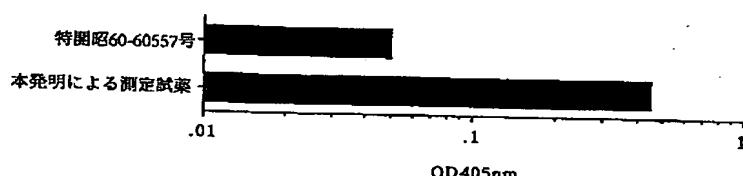
【図1】



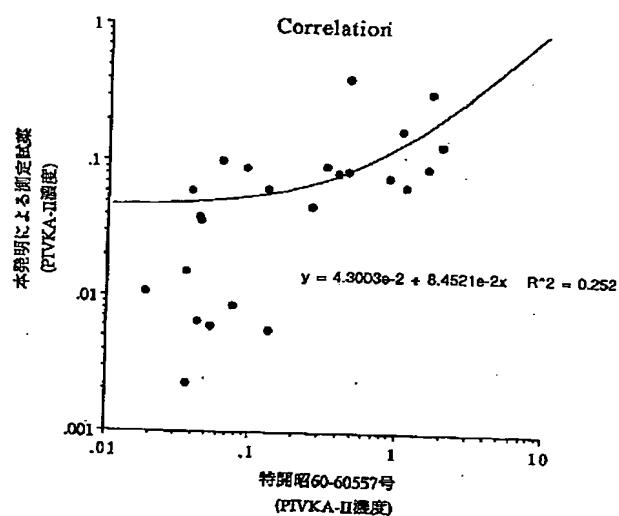
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:91)

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所